




New macrocyclic tetraether lipid derivatives

Patent number: DE19736592
Publication date: 1999-02-25
Inventor: FREISLEBEN H-J DR (DE); BALAKIREV MAXIM (RU);
 HARTMANN KLAUS (DE); ANTONOPOULOS
 EMMANOUIL (DE); BALAKIREVA LARISSA (RU);
 GROPP FELIX (DE)
Applicant: SYRINX DIAGNOSTIKA GMBH (DE); FREISLEBEN
 CONSULTING DR (DE)
Classification:
 - **International:** (IPC1-7): C07D323/00; A61K9/127; A61K48/00;
 G01N33/92; C12P7/00; G01N33/53
 - **European:** A61K9/127B2; A61K48/00; C07D323/00; C12N15/88
Application number: DE19971036592 19970822
Priority number(s): DE19971036592 19970822

Also published as:

 WO9910337 (A)
 EP1005466 (A1)
 CA2269502 (C)

Report a data error he

Abstract of DE19736592

Macrocyclic tetraether lipid derivatives (I) and liposomes or liposome aggregates containing (I) are new. Tetraether lipid derivatives of formula (I), consisting of a 72-membered macrocyclic dibiphytanyl-diethyl-tetraether ring derivatized by two substituted carbamoyl groups, and derivatives of (I) modified by the formation of 'pentacycles' in the tetraether structure, are new. S1,S2 = -CONH-X1-N(R1)n-X2-Y; Y = NR2R3 or -N<+>R4R5R6; X1,X2 = 2-20C alkylene or alkenylene; R1-R6 = H or alkyl, alkenyl, aralkyl or aryl (all of up to 12C); or one of R1-R6 = antibody against cell surface molecules or ligand for cell surface receptors; n = 0-10. Independent claims are included for liposomes and lipid aggregates containing at least one compound (I), optionally together with a nucleic acid molecule.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

BEST AVAILABLE COPY

①⑨ **BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT**

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 197 36 592 A 1**

⑳ Aktenzeichen: 197 36 592.2
㉒ Anmeldetag: 22. 8. 97
㉔ Offenlegungstag: 25. 2. 99

⑤① Int. Cl.⁶:
C 07 D 323/00
A 61 K 9/127
A 61 K 48/00
G 01 N 33/92
C 12 P 7/00
// G01N 33/53

DE 197 36 592 A 1

⑦① Anmelder:
Syrinx-Diagnostika GmbH, 60529 Frankfurt, DE; Dr.
Freisleben Consulting, 64390 Erzhausen, DE

⑦④ Vertreter:
Grünecker, Kinkeldey, Stockmair & Schwanhäuser,
Anwaltssozietät, 80538 München

⑦② Erfinder:
Freisleben, H.-J., Dr., 64390 Erzhausen, DE;
Balakirev, Maxim, Novosibirsk, RU; Hartmann,
Klaus, 69115 Heidelberg, DE; Antonopoulos,
Emmanouil, 63263 Neu-Isenburg, DE; Balakireva,
Larissa, Novosibirsk, RU; Gropp, Felix, 65812 Bad
Soden, DE

⑤⑥ Entgegenhaltungen:
Appl.Mikrobiol.Biotechnol. 40 (1994), S. 745-752;
System.Appl.Mikrobiol. 7 (1986), S. 253-257;

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

- ⑤④ Tetraetherlipidderivate und Tetraetherlipidderivate enthaltende Liposomen und Lipidagglomerate sowie deren Verwendung
- ⑤⑦ Herkömmliche Liposomen, die zum Transport von pharmazeutischen Wirkstoffen in eukaryontische Zellen oder zur Lipofektion verwendet werden, sind nur begrenzt haltbar, nicht säurestabil und erfordern die Bestimmung einer Vielzahl von Parametern, damit zufriedenstellende Ergebnisse erzielt werden können. Die Entwicklung weniger empfindlicher Liposomen ist daher wünschenswert. Erfindungsgemäß werden Tetraetherlipidderivate bereitgestellt, die sehr stabil und gut zur Lipofektion geeignet sind.

DE 197 36 592 A 1

Die vorliegende Erfindung betrifft Tetraetherlipidderivate, die erfindungsgemäßen Tetraetherlipidderivate enthaltende Liposomen und Lipidagglomerate und deren Verwendung.

In der wissenschaftlichen Forschung besteht ein großer Bedarf an Verfahren zur Transfektion von Zellen in Zellkultur und multizellulären Organismen mit Nukleinsäuren. Die herkömmlichen Verfahren wie Elektroporation, DEAE- und "Calciumphosphat"-unterstützte Transfektion, Mikroinjektion oder ballistische Methoden haben den Nachteil, daß sie oft nur geringe Transfektionseffizienzen erreichen, die Zellüberlebensraten sehr gering sind und/oder, daß sie nicht an Mehrzellern durchführbar sind. Virale und retrovirale Transfektionssysteme sind zwar effizienter, bergen aber eigene Risiken, wie z. B. eine erhöhte Immunantwort oder eine unkontrollierte Integration in das Zielgenom. Die Transfektion von nicht-viralen Nukleinsäuren mit Hilfe von Liposomen, auch Lipofektion genannt, stellt daher eine erfolgreiche und bereits häufig angewandte Alternative zu den oben beschriebenen Verfahren dar.

Liposomen sind künstlich hergestellte uni- oder multilamellare Lipidvesikel, die einen wäßrigen Innenraum umschließen. Sie sind im allgemeinen biologischen Membranen ähnlich und werden daher nach Anlagerung an dieselben oftmals leicht in die Membranstruktur integriert. Bei dieser Membranfusion wird der Inhalt des Liposomeninneren in das von der biologischen Membran umschlossene Lumen entladen. Alternativ werden die Liposomen durch endocytotische Vorgänge in das Cytosol der zu transfizierenden Zelle gebracht; sie werden anschließend entweder im Cytosol zerstört oder treten als solche in Wechselwirkung mit der Kernmembran. Im letzteren Fall sind die im wäßrigen Innenraum des Liposoms enthaltenen Verbindungen weitgehend gegen proteolytische oder nukleolytische Angriffe geschützt.

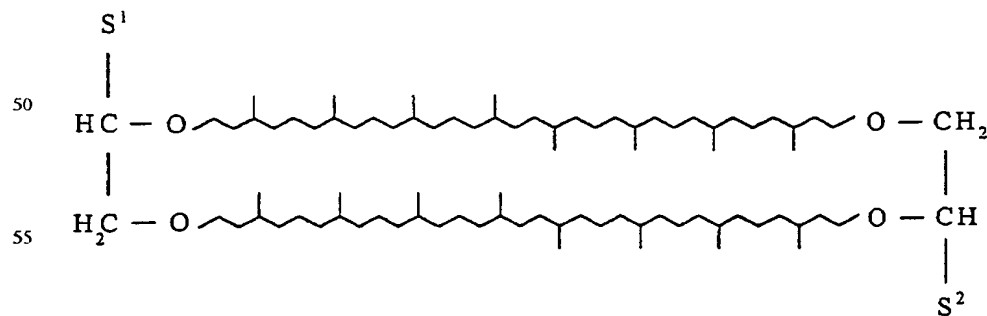
Liposomen können daher als Transportvehikel für Stoffe, wie z. B. Nukleinsäuren und Pharmazeutika benutzt werden. So stellt z. B. die Kosmetikindustrie Liposomen-haltige Hautcremes her, die Wirkstoffe zielgerichtet in die Epidermis und tiefer gelegene Zellschichten transportieren. Zur Herstellung von Liposomen werden hauptsächlich natürliche Lecithine aus Sojabohnen oder Eigelb bzw. definierte natürliche oder künstliche Phospholipide, wie Cardiolipin, Sphingomyelin, Lysolecithin und andere verwendet. Durch Variation der polaren Kopfgruppen (Cholin, Ethanolamin, Serin, Glycerin, Inosit), der Länge und der Sättigungsgrade der Kohlenwasserstoffketten werden Größe, Stabilität und Fähigkeit zur Aufnahme und Freisetzung der assoziierten Moleküle beeinflußt.

Einer der wesentlichen Nachteile der bis heute bekannten Liposomen ist ihre geringe Stabilität. Aus normalen Doppelschicht-bildenden Phospholipiden gebildete Liposomen sind auch im gekühlten Zustand nur kurze Zeit haltbar. Ihre Lagerstabilität läßt sich zwar z. B. durch Einbeziehen von Phosphatidsäure erhöhen, jedoch ist die somit verbesserte Stabilität für viele Zwecke immer noch unzureichend. Außerdem sind herkömmliche Liposomen nicht säurestabil und daher weder für den Transport pharmazeutischer Wirkstoffe geeignet, die nach oraler Verabreichung den Magen passieren, noch für die Liposomen-unterstützte DNA-Transfektion unter leicht sauren pH-Bedingungen.

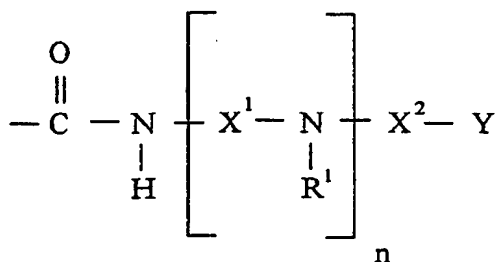
Für wissenschaftliche und medizinische Lipofektionen in Säugerzellen werden Liposomen-bildende Lipidmischungen, z. B. Lipofectamin®, Lipofectin® oder DOTAP®, häufig benutzt. Neben den bereits erwähnten Nachteilen ist mit ihrer Anwendung die Notwendigkeit verbunden, eine Vielzahl von Parametern (z. B. Zelldichte, Nukleinsäuremenge, Anteil der zugesetzten Lipide, Volumen des Liposomenansatzes etc.) genau zu bestimmen, weil es nur ein sehr enges Parameteroptimum gibt, bei dem ausreichende Transfektionseffizienzen erreicht werden können. Dadurch werden Transfektionen unter Verwendung kommerzieller Lipofektionsreagenzien sehr aufwendig und kosten intensiv. Desweiteren sind bei den obengenannten Produkten große Variationen zwischen den einzelnen Chargen zu beobachten, was sie in der Praxis wenig verläßlich macht.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher, Lipofektionsmittel mit größerer mechanischer und chemischer Stabilität und damit verlängerter Lagerfähigkeit herzustellen, die eine einfache und verläßliche Anwendbarkeit ermöglichen.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst durch das Bereitstellen von Tetraetherlipidderivaten (im folgenden auch als "TEL-Derivate" abgekürzt) mit der allgemeinen Formel (I):



60 wobei S^1 und S^2 gleich oder verschieden sein können und jeweils die folgende Bedeutung haben:



und

Y kann -NR²R³ oder -N⁺R⁴R⁵R⁶ bedeuten;

X¹ und X² können gleich oder verschieden sein und sind jeweils unabhängig voneinander ausgewählt aus der Gruppe, die ein verzweigtes oder unverzweigtes Alkylen oder Alkenylen mit 2 bis 20 Kohlenstoffatomen umfaßt;

R¹ bis R⁶ können gleich oder verschieden sein und sind jeweils unabhängig voneinander ausgewählt aus der Gruppe, die umfaßt: Wasserstoff, verzweigte oder unverzweigte Alkyl-, Alkenyl-, Aralkyl- oder Arylgruppen mit 1 bis 12 Kohlenstoffatomen, wobei jeweils einer der Reste R² bis R⁶ weiter einen Antikörper gegen Zelloberflächenmoleküle oder einen Liganden für Zelloberflächen-Rezeptoren umfassen kann; und

n kann eine ganze Zahl zwischen 0 und 10 bedeuten,

sowie durch Bildung von Pentazyklen im Tetraethergrundgerüst gebildete Modifikationen davon.

Das Lipidgerüst der erfindungsgemäßen Tetraetherlipidderivate besteht aus einem 72-gliedrigen Makrotetraetherzyklus, dessen Grundgerüst ein Dibiphytanyl-diethyl-tetraetherheterozyklus ist. In diesem sind die ω-Kohlenstoffatome der Phytanylketten von jeweils 2 Diethermolekülen kovalent miteinander verbunden. Tetraetherlipide sind bereits bekannt und bisher ausschließlich in Archaeobakterien nachgewiesen worden. In Abhängigkeit z. B. von der Züchtungstemperatur können sich innerhalb der Dibiphytanylketten Pentazyklen ausbilden, die dem Lipid einen spezifischen physikochemischen Charakter geben. Mit jeder Pentazyklisierung verliert das Grundgerüst zwei Wasserstoffatome. Eine Zusammenfassung aller bisher bekannten Basisstrukturen archaeobakterieller Lipide ist in Langworthy und Pond (System Appl. Microbiol. 7, 253-257, 1986) enthalten.

Das natürlich vorkommende Lipidgerüst ist nunmehr erfindungsgemäß derivatisiert worden, um für den Einbau in zur Transfektion vorgesehene Liposomen oder Lipidagglomerate geeignet zu sein. Dazu werden Seitenketten eingeführt, die entweder per se durch Ausbildung quaternärer Ammoniumsalze oder unter physiologischen Bedingungen, d. h. bei einem pH von 7,35 bis 7,45, positiv geladen sind. Solcherart derivatisierte Lipide sind besonders gut geeignet, mit negativ geladenen Molekülen, beispielsweise Nukleinsäuremolekülen, in Kontakt zu treten und sie z. B. in Liposomen einzuschließen. Da ein möglicher Verwendungszweck der erfindungsgemäßen Lipide in der Bildung von Liposomen oder Lipidagglomeraten für gentherapeutische Anwendungen liegt, können die erfindungsgemäßen Lipide zusätzlich mit Molekülen gekoppelt werden, die das spezifische Andocken der Lipide an spezielle Zellen ermöglichen. Beispiele dafür sind Antikörper gegen Zelloberflächenantigene, insbesondere solche, die selektiv auf den Zielzellen exprimiert werden. Möglich sind weiter Liganden für Rezeptoren, die auf der Oberfläche bestimmter Zellen selektiv anzutreffen sind, sowie biologisch aktive Peptide, die ein Organ- bzw. Zell-spezifisches Targeting in vivo ermöglichen (Ruoslahti, Science, 1997). Letztere wurden für die Zwecke dieser Anmeldung ebenfalls als Liganden bezeichnet.

Der besondere Vorteil der erfindungsgemäßen Tetraetherlipidderivate liegt darin, daß ihr Lipidgerüst keine Doppelbindungen enthält und daher unempfindlich gegen Oxidation ist. Weiterhin enthält es statt der in Lipiden aus Eubakterien und Eukaryonten enthaltenen Lipidesterbindungen nur Lipidetherbindungen, die auch bei hohen Protonenkonzentrationen, wie sie z. B. im Magen auftreten, nicht angegriffen werden.

In bevorzugten Ausführungsformen sind die Substituenten S¹ und S² an beiden Enden des Tetraetherlipidgrundgerüsts gleich. Dies ermöglicht, ausgehend von natürlichen Tetraetherlipiden, die Synthese ohne zwischenzeitliche Verwendung von Schutzgruppen. Die Identität der Substituenten S¹ und S² ist besonders bevorzugt in solchen Fällen, in denen keiner der Reste R¹ bis R⁶ einen Antikörper oder Liganden für einen Zelloberflächenrezeptor darstellt.

In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Tetraetherlipidderivates stellt die Gruppe X¹ sowohl in S¹ als auch in S² ein Alkylen oder Alkenylen mit 2 bis 10, bevorzugt mit 3 bis 6 Kohlenstoffatomen dar. In ganz besonders bevorzugten Ausführungsformen handelt es sich bei X¹ um Propylen.

Die Gruppe X² ist ebenfalls bevorzugt ein Alkylen oder Alkenylen mit 2 bis 10, bevorzugt mit 3 bis 6 Kohlenstoffatomen. Auch für X² sind Propylenreste besonders bevorzugt.

n kann 0 bis 10 bedeuten. In bevorzugten Ausführungsformen ist n 0 bis 3, ganz besonders bevorzugt 0.

Die erfindungsgemäßen Tetraetherlipidderivate werden bevorzugt aus natürlichen Tetraetherlipiden hergestellt, die z. B. aus Archaeobakterien isolierbar sind. Wie oben bereits erwähnt, treten in den aus natürlichen Quellen isolierten Tetraetherlipiden in einem gewissen Umfang Pentazyklen innerhalb der Dibiphytanylketten auf. Das Ausmaß der Pentazyklisierung kann durch die Züchtungstemperatur beeinflusst werden. Normalerweise finden sich 0 bis 8 Pentazyklen pro Tetraethergrundgerüst, wobei bei einer Züchtungstemperatur von 39° die meisten Lipidmoleküle zwischen 1 und 5 Pentazyklen aufweisen, während bei einer Züchtungstemperatur von 59° überwiegend 3 bis 6 Pentazyklen beobachtet werden. Die folgende Tabelle gibt Auskunft über die Verteilung der Pentazyklisierung bei einer Züchtungstemperatur von 39°C bzw. 59°C:

TABELLE

Anzahl der Pentazyklen	%-Anteil bei Züchtungs- temperatur von 39°	%-Anteil bei Züchtungs- temperatur von 59°C
0	5,5 ± 0,5	6,6 ± 0,5
1	17,3 ± 0,4	9,2 ± 1,2
2	23,0 ± 4,0	9,4 ± 0,05
3	23,4 ± 0,5	17,1 ± 1,4
4	14,8 ± 1,3	19,0 ± 1,3
5	10,8 ± 1,0	21,6 ± 0,3
6	3,6 ± 0,0	11,7 ± 0,2
7	1,2 ± 0,5	4,7 ± 0,3
8	0,5 ± 0,4	0,8 ± 0,3

In weiteren Ausführungsformen des erfindungsgemäßen Tetraetherlipidderivates bedeutet Y sowohl in S¹ als auch in S² -NR²R³. Dabei sind R² und R³ bevorzugt Wasserstoff, verzweigte oder unverzweigte Alkyl-, Alkenyl-, Aralkyl- oder Arylgruppen besonders bevorzugt Wasserstoff-, Methyl-, Ethyl- oder Propylgruppen. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform bedeutet Y sowohl in S¹ als auch in S² ein quaternäres Anmoniumsals, dessen Reste R⁴, R⁵ und R⁶ ebenfalls bevorzugt Wasserstoff-, verzweigte oder unverzweigte Alkyl-, Alkenyl-, Aralkyl- oder Arylgruppen mit 1 bis 12 Kohlenstoffatomen, besonders bevorzugt Wasserstoff, Methyl, Ethyl oder Propyl sind. Jeweils einer der Reste R² bis R⁶ kann einen Antikörper gegen Zelloberflächenmoleküle oder einen Liganden für Zelloberflächen-Rezeptoren umfassen.

In besonders bevorzugten Ausführungsformen hat das erfindungsgemäße Tetraetherlipidderivat die allgemeine Formel (I) mit den nachstehend angegebenen Substituenten und S²:

Verbindung A

S¹ und S²: -CO-NH-(CH₂)₃-NH₂.

Verbindung B

S¹ und S²: -CO-NH-(CH₂)₃-N(CH₃)₂.

Verbindung C

S¹ und S²: -CO-NH-(CH₂)₃-N[⊕](CH₃)₃.

Die erfindungsgemäßen Tetraetherlipidderivate können z. B. aus dem Gesamtlipidextrakt von Archaeobakterien, z. B. dem Gesamtlipidextrakt des Archaeobakteriums *Thermoplasma acidophilum* gewonnen werden. *Thermoplasma acidophilum* wachsen zwischen pH 1 und 4 und bei Temperaturen von 33 bis 67°C. *Thermoplasma acidophilum* kann, wie in Beispiel 1 wiedergegeben, kultiviert werden. Üblicherweise wird eine bis zu einer OD₅₇₈ von ca. 0,6 gezüchtete Kultur des Mikroorganismus geerntet und die geernteten Mikroorganismen entweder direkt zur Lipidgewinnung eingesetzt oder gefriergetrocknet und gelagert. Für die Gewinnung der Tetraetherlipide aus dem Gesamtlipidextrakt von *Thermoplasma acidophilum* wird dieser einer Säurehydrolyse unterzogen, um Tetraether zu produzieren (Beispiel 2 und Abb. 7). Oxidation der freien Hydroxylgruppen am Tetraether zu Dicarbonsäureverbindungen, Reaktion dieser Dicarbonsäureverbindungen mit SOCl₂ und Umsetzung der entstandenen Carbonsäurechloride mit Aminen resultiert in der Bildung verschiedener Tetraetherlipidderivate (Beispiel 3 und Abb. 7).

Die erfindungsgemäßen TEL-Derivate können zum Herstellen von Lipofektionsmitteln verwendet werden. Lipofektionsmittel sind z. B. Liposomen oder Lipidagglomerate. Verfahren zum Herstellen von Liposomen sind allgemein bekannt. Generell wird dabei das zur Präparation der Liposomen vorgesehene Lipid zunächst in einem organischen Lösungsmittel gelöst und durch Evaporation ein Lipidfilm gebildet. Der Lipidfilm wird gut getrocknet, um sämtliche Lösungsmittelreste zu entfernen. Anschließend werden die Lipide dieses Filmes in einem geeigneten Puffersystem resuspendiert. Für medizinisch-pharmazeutische Zwecke eignet sich z. B. physiologische Kochsalzlösung, pH 7,4, jedoch sind andere Puffersysteme (z. B. McIlvaine-Puffer), oder ungepufferte Lösungen, wie z. B. ungepufferte Kalium- oder Natriumchloridlösungen, ebenfalls verwendbar. Die Puffermenge sollte so berechnet sein, daß sie später eine Liposomendispersion mit maximal 15–20 mg Lipid/ml Puffer ergibt. Durch Schütteln mit der Hand können zunächst große multilamellare Vesikel mit einer Größenverteilung im µm-Bereich gebildet werden. Die Bildung dieser Vesikel kann durch Verwendung von zwei Glaskügelchen und/oder eines Ultraschallbades mit geringer Schallintensität erleichtert werden. Für die eigentliche Präparation von unilamellaren Liposomen definierter Größe wurden folgende Methoden getestet und als für die Herstellung von Liposomen aus erfindungsgemäßen Tetraetherlipidderivaten geeignet befunden:

(a) Ultraschallbehandlung: Die Suspension multilamellarer Liposomen wird bei 20 kHz 5 Minuten beschallt (Branson Sonifer B 15). Es bilden sich Liposomen mit einem Durchmesser um 500 nm.

(b) Extrusion durch eine French Druckzelle: Die Suspension multilamellarer Liposomen wird bei 16 000 p.s.i. viermal in der French Druckzelle extrudiert (SLM-Aminco Inc., Urbana IL, USA). Es bilden sich Liposomen mit einem Durchmesser um 120 nm.

(c) Extrusion durch Polycarbonatfilter: Die Suspension multilamellarer Liposomen wird durch Polycarbonatfilter definierter Porengröße extrudiert (Liposol'ast[®], Avestin, Ottawa, Kanada). Bei Verwendung von Filtern mit einer Porengröße von 100 oder 200 nm entstehen Liposomen, die in der Größenverteilung geringfügig oberhalb der Porengröße liegen. Die Extrusion durch Filter dieser geringen Porengröße kann gleichzeitig als Sterilfiltration dienen, sofern alle sonstigen Voraussetzungen für eine Sterilfiltration (z. B. exakte Trennung der unsterilen und sterilen Seiten der Filtrationsapparatur) eingehalten werden. Um die eigentliche Filtration zu erleichtern, können einige Vorbehandlungen getroffen werden:

(ca) Die Suspension multilamellarer Liposomen wird bei 20 kHz zwischen 1 und 5 Minuten beschallt (s. (a))

(cb) Die Suspension multilamellarer Liposomen wird 1–3 mal gefroren und wieder aufgetaut.

(cc) Die Suspension multilamellarer Liposomen nach (ca) oder (cb) wird durch einen Polycarbonatfilter von 600 bis 800 nm Porengröße vorfiltriert.

Im Anschluß an die Ultraschallbehandlung bzw. Extrusion können die Liposomen in einer Eppendorffzentrifuge 3200 10 Minuten zentrifugiert werden, um nichtliposomales Material zu entfernen. Intakte, geschlossene Vesikel bleiben im Überstand.

Liposomen können weiter durch Detergenzsolubilisierung mit anschließender Detergenzdialyse hergestellt werden. Dazu wird zunächst wie oben beschrieben ein Lipidfilm gebildet. Dieser wird in einem detergenzhaltigen Puffersystem suspendiert (Beispiele dialysierbarer Detergenzien: Octyl- β -D-Glucopyranosid oder Octyl- β -D-Thiogluco-pyranosid). Das molare Verhältnis (TEL-Derivat: Detergenz) sollte bei den genannten Detergenzien zwischen 0,05 und 0,3 liegen und die Puffermenge so berechnet sein, daß sich später eine Liposomendispersion mit maximal 15–20 mg Lipid pro ml Puffer ergibt. Durch Schütteln mit der Hand werden Mischmizellen aus Detergenz und TEL-Derivat gebildet.

Die Suspension der Mischmizellen wird nun in Dialyseschläuche, z. B. in eine Lipoprep[®]-Dialysezelle oder in eine Mini-Lipoprep[®] Dialysezelle (Diachema AG, Langnau, Schweiz) übertragen und bei RT 24 Stunden dialysiert. Bei Entzug des Detergenz durch die Dialyse bilden sich aus den Mischmizellen Liposomen von etwa 400 nm Durchmesser.

Die Liposomen-Präparation kann in einer Eppendorffzentrifuge 3200 10 Minuten zentrifugiert werden, um nichtliposomales Material zu entfernen. Intakte, geschlossene Vesikel bleiben im Überstand.

Die erfindungsgemäßen Lipidagglomerate bestehen aus einer oder mehreren Schichten der erfindungsgemäßen TEL-Derivate. Zwischen jeweils zwei solcher Schichten können sich negativ geladene Moleküle, z. B. Nukleinsäuremoleküle, einlagern.

Lipofektionsmittel, die zu 100% aus erfindungsgemäßen TEL-Derivaten bestehen, haben sich dabei als außergewöhnlich stabil, nahezu unbegrenzt lagerfähig und protonenundurchlässig erwiesen. Für viele Anwendungen, darunter die Formulierung von Pharmazeutika mit säurelabilen Wirkstoffen, und die Transfektion von Eukaryontenzellen stellen reine TEL-Derivat-Lipofektionsmittel daher das Mittel der Wahl dar.

Als vorteilhaft hat sich auch die Herstellung von Lipofektionsmitteln erwiesen, die neben einem Anteil von TEL-Derivat übliche Doppelschicht-bildende Phospholipide enthalten, wobei dieser Gewichtsprozentanteil auf das Gesamtlipid bezogen ist (Mischliposomen bzw. Mischlipidagglomerate). Die Herstellung von Mischlipofektionsmitteln erfolgt analog der Herstellung von reinen TEL-Derivat-Lipofektionsmitteln.

Bei diesen Doppelschicht-bildenden Phospholipiden kann es sich beispielsweise handeln um Sphingomyeline, Cephaline, Lecithine und Cardiolipin. Besonders bevorzugt ist der Zusatz von kationischen Lipiden wie DOTMA (N-[1-(2,3-Dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammoniumchlorid) (Life Technologies, Gaithersburg, USA) oder DOTAP (N-[1-(2,3-Dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammoniumchlorid) (Boehringer Mannheim, FRG) oder DOSPER (Boehringer Mannheim). Zur Unterstützung der Transfektionseffizienz können auch neutrale Lipide wie z. B. DOPE (Dioleoylphosphatidylethanolamin) (Sigma) in die Herstellung der TEL-Derivatliposome einbezogen werden (Beispiel 5). In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform werden Cholesterin und/oder seine Derivate in die Membran eingebaut. Darüber hinaus kann jedes weitere für die Bildung von Liposomen oder Lipidagglomeraten geeignete Lipid herangezogen werden. Der besondere Vorteil der erfindungsgemäßen Mischlipofektionsmittel ist ihre durch den TEL-Derivatanteil verbesserte (erhöhte) Stabilität, verglichen z. B. mit Liposomen ohne TEL-Derivatanteil.

In den erfindungsgemäßen Mischlipofektionsmitteln beträgt das Verhältnis von Tetraetherlipidderivat zu weiteren Lipiden bevorzugt 5 : 1 bis 1 : 5. In besonders bevorzugten Ausführungsformen beträgt das Verhältnis 1 : 2 bis 1 : 0,5, besonders bevorzugt 1 : 1. Alle Angaben beziehen sich auf Gewichtsverhältnisse.

Im folgenden beziehen sich die Ausdrücke "TEL-Derivatliposom", "Liposom aus reinem TEL-Derivat" etc. auf Liposomen, deren Lipidanteil zu 100% aus erfindungsgemäßen TEL-Derivaten, bevorzugt TEL aus *Thermoplasma acidophilum* besteht. Gleiches gilt für die Ausdrücke "Tetraetherlipidderivatagglomerat" und verwandte Ausdrücke.

"Mischliposomen" und "Misch-Lipidagglomerate" umfassen zusätzlich herkömmliche Phospholipide, und die Ausdrücke "Liposom" bzw. "Lipidagglomerat" umfassen sowohl Liposomen bzw. Lipidagglomerate aus reinen TEL-Derivaten als auch Mischliposomen bzw. Misch-Lipidagglomerate.

Die erfindungsgemäßen Liposomen einschließlich der Mischliposomen sowie die Lipidagglomerate einschließlich der Mischagglomerate können als Transportvehikel für Nukleinsäuren und/oder kosmetische, pharmazeutische Wirkstoffe dienen. Die erfindungsgemäßen Liposomen und Lipidagglomerate ermöglichen darüber hinaus einen zielgerichteten Gentransfer. Dazu werden Nukleinsäuren, z. B. DNA- oder RNA-Sequenzen, die Gene oder Genfragmente enthalten und in linearer Form oder in Form von circular geschlossenem Vektoren, die weiteres genetisches Material enthalten können, vorliegen, in reine TEL-Liposomen oder Mischliposomen, reine Lipidagglomerate und Mischagglomerate verpackt und den zu transfizierenden Zellen in vitro oder in vivo zugesetzt. Wenn die Liposomenmembran bzw. Agglomeratoberfläche darüber hinaus Antikörper enthält, für die entsprechende Proteine oder Peptide auf den mit der Genthherapie zu erreichenden Zellen vorhanden sind, so wird durch den Kontakt zwischen Antigen auf der Zielzelle und Antikörper in der Mem-

bran des erfindungsgemäßen Liposomes bzw. Agglomeratoberfläche ein Kontakt zwischen Liposom- bzw. Agglomeratoberfläche und Zielzelle gefördert.

Die Erfindung betrifft weiterhin eine pharmazeutische Zusammensetzung, die die erfindungsgemäßen Liposomen oder Lipidagglomerate enthält.

Die erfindungsgemäßen Liposomen und/oder Lipidagglomerate werden bevorzugt bei solchen Wirkstoffen als Transportvehikel eingesetzt, bei denen eine orale Applikation nicht möglich ist, weil diese Wirkstoffe in der sauren Magenflüssigkeit inaktiviert oder durch Lipasen oder Peptidasen im Dünndarm abgebaut werden würden. Die erfindungsgemäßen Liposomen und Lipidagglomerate sind jedoch säurestabil und können deshalb ungehindert durch den Magen z. B. in den Dünndarm gelangen und eingeschlossene Wirkstoffe, die nach oraler Applikation normalerweise nicht in die Blutbahn gelangen können, dort zur Resorption bringen. Die Wirkstoffe können im wäßrigen Lumen des Liposoms enthalten sein, zwischen den Schichten der Lipidagglomerate vorliegen oder in diese integriert sein. Sofern es sich bei dem zu transportierenden Wirkstoff um Nukleinsäuren handelt, ist dieser meistens geschützt im Liposom oder zwischen den Agglomeratschichten. In einer weiteren Ausführungsform ist der Wirkstoff kovalent an das im Liposom enthaltene TEL gebunden. Bevorzugte Wirkstoffe sind z. B. Cytostatika, Immunsuppressiva, Immunstimulanzien oder Impfstoffe sowie Hormone. Die Lokalisierung des Wirkstoffes im Lumen oder in der Membran ist abhängig von seiner Wasser- bzw. Lipidlöslichkeit und wird vom Öl/Wasser-Verteilungskoeffizienten bestimmt. Viele Wirkstoffe haben eine intermediäre Verteilung, d. h. sowohl eine gewisse Wasser- als auch Lipidlöslichkeit, gemäß derer sie sich innerhalb eines Liposomes auf Lumen und Membran verteilen. Weitere Beispiele für im Lumen gelöste Wirkstoffe sind Impfstoffe, Hormone und wasserlösliche Anteile bzw. Derivate von Daunorubicin und Doxorubicin bzw. von Methylprednisolon. Ein bevorzugtes Methylprednisolonderivat ist dabei das Natriumsalz des Methylprednisolon-Hydrogensuccinats. Bevorzugte kovalent gebundene Wirkstoffe sind dagegen beispielsweise Antikörper, Hormone, Lectine und Interleukine oder aktive Fragmente dieser Stoffgruppen.

Es konnte gezeigt werden, daß die erfindungsgemäßen Liposomen bzw. Lipidagglomerate besonders gut mit Zellmembranen wechselwirken können. Nachgewiesen wurde z. B. die Aufnahme von mit dem lipophilen Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin gekoppelten Tetraetherlipidderivaten durch die Zellmembran von Baby Hamster Kidney (BHK)-Zellen (s. Abb. 1 und Beispiel 5.2).

Mit den erfindungsgemäßen Liposomen oder Lipidagglomeraten könnten daher auch Tumoren gezielt bekämpft werden, indem z. B. tumorspezifische Antikörper bzw. Antikörperfragmente in die Liposomenmembran eingebaut werden, die die mit Wirkstoffen gefüllten Liposomen der Lipidagglomerate zielgerichtet in Tumorzellen lotsen. Eine chemotherapeutische Behandlung mit zielgerichtet wirkenden Chemotherapeutika trägt dazu bei, unerwünschte Nebenwirkungen drastisch zu reduzieren.

In einer weiteren erfindungsgemäßen Ausführungsform dienen die erfindungsgemäßen TEL-Derivate in reiner Form oder als Bestandteil von reinen oder gemischten Liposomen oder Lipidagglomeraten als Grundlage für die Herstellung medizinischer Salben oder Hautcremes.

Ein weiteres mögliches Anwendungsgebiet für die erfindungsgemäßen TEL-Derivate, für Liposomen oder Lipidagglomerate aus reinen TEL-Derivaten aus *Thermoplasma acidophilum* oder die diese TEL-Derivate enthaltenden Mischliposomen oder Misch-Lipidagglomerate ist die Verwendung dieser Substanzen in der medizinischen Diagnostik. Dabei können z. B. Mikrotiterplatten mit TEL-Derivaten, TEL-Derivatliposomen oder TEL-Derivatnischliposomen beschichtet werden, die durch Konjugation mit spezifischen Antikörpern oder Antigenen erhalten worden sind. Solcher Art beschichtete Träger können z. B. für die immunometrische Bestimmung von Proteinen, Peptiden oder Stoffwechselprodukten eingesetzt werden.

Die folgenden Abbildungen und Beispiele erläutern die Erfindung.

Beschreibung der Abbildungen

Abb. 1 zeigt mikroskopische Aufnahmen von BHK-Zellen, die mit Rhodamingekoppeltem Tetraetherlipidderivat B (10 µg/ml) 70 Min vorinkubiert worden sind.

Abb. 1A ist eine Phasenkontrastaufnahme,

Abb. 1B zeigt die Fluoreszenz, aufgenommen mit roten Emissions- und grünen Extinktionsfiltern.

Abb. 2 zeigt die Ethidiumbromidfluoreszenz von DNA-Tetraetherlipidderivat-Komplexen bei unterschiedlichen DNA:Lipidverhältnissen. Der der Abbildung zugrunde liegende Versuch ist im Beispiel 4.2.2 beschrieben.

Abb. 3 zeigt ein mit Ethidiumbromid angefärbtes Agarosegel (1%), auf dem DNA/Tetraetherlipidderivat-Komplexe mit unterschiedlichen molaren Verhältnissen von DNA zu Tetraetherlipid elektrophoretisiert worden sind. Bei der aufgetragenen DNA handelt es sich um pSV-lacZ, das verwendete TEL-Derivat war Verbindung B. Mit den Verbindungen A und C sind gleiche Ergebnisse erhalten worden.

Die Spuren zeigen im einzelnen:

Spur 1: Größenmarker (λ HindIII: 23130, 9416, 6557, 4361, 2322, 2027, 5634 und 125 bp)

Spur 2: molares DNA-Lipidverhältnis von 1 : 0

Spur 3: molares DNA-Lipidverhältnis von 1 : 0,7

Spur 4: molares DNA-Lipidverhältnis von 1 : 1,4

Spur 5: molares DNA-Lipidverhältnis von 1 : 2,1

Spur 6: molares DNA-Lipidverhältnis von 1 : 2,8.

Abb. 4 zeigt die Effizienz der Transfektion von BHK-Zellen mit dem Tetraetherlipidderivat B bei einer konstanten DNA-Konzentration von 1,4 µg/ml, in Abhängigkeit von der Lipidkonzentration im Medium. Mit den Verbindungen A und C sind gleiche Ergebnisse erhalten worden.

Abb. 5 zeigt den Zeitverlauf der Expression von β -Galactosidase nach Inkubation von BHK-Zellen mit Tetraetherlipidderivat-Komplexen, die das für β -Galactosidase kodierende Plasmid pSV-lacZ (Promega) enthielten. Es wurden 1,2 µg DNA und 5 µg Tetraetherlipidderivat B pro Transfektionsansatz eingesetzt. Mit den Tetraetherlipidderivaten A

und C sind gleiche Ergebnisse erhalten worden.

Abb. 6 zeigt die Transfektionseffizienz von reinen Tetraetherlipidderivat-Liposomen im Vergleich zu Mischliposomen mit DOPE (molares Verhältnis 1 : 1), PC (molares Verhältnis 1 : 1) und MPL (molares Verhältnis Tetraetherlipidderivat B zu MPL wie 1 : 2) (MPL: "main phospholipid" aus *Thermoplasma acidophilum*, Gesamtlipidfraktion, s. PCT/EP97/01011). Die Ergebnisse mit den Derivaten A und B sind vergleichbar.

Abb. 7 zeigt das Reaktionsschema zur Synthese verschiedener TEL-Derivate. Der Tetraethermakrozyklus ist dabei durch das jeder Formel zentrale Rechteck dargestellt. Im einzelnen zeigt:

Abb. 7a die Umsetzung eines natürlichen Tetraetherlipides, z. B. isoliert aus *Thermoplasma acidophilum*, mit 1 molar Salzsäure in Methanol zur Entfernung der Zuckerreste zur Dihydroxyverbindung (2). Verbindung (2) wird anschließend zur Dicarbonsäure (3) umgesetzt.

Abb. 7b zeigt die Umsetzung der Dicarbonsäure (3) zum entsprechenden Dicarbonsäurechlorid (4). Das Dicarbonsäurechlorid dient als Edukt für die Umsetzung mit Aminen. Gemäß Reaktion 4a wird mit 1,3-Diaminopropan zum Tetraetherlipidderivat (A) umgesetzt. Gemäß Reaktion Nr. 4b erfolgt die Umsetzung des Dicarbonsäurechlorides mit 3-Dimethylaminopropylamin zum Tetraetherlipidderivat B.

Abb. 7c Das Tetraetherlipidderivat B reagiert mit Dimethylsulfat zum Tetraetherlipidderivat C.

Beispiel 1

Kultivierung und Konservierung von *Thermoplasma acidophilum*

1.1 Medium

Das Kulturmedium für *Thermoplasma acidophilum* setzt sich aus Freundt'schem Medium (Christiansen et al., (1975)), einer 20%igen (w/v) Glucoselösung und einer 20%igen (w/v) Hefeextraktlösung (Difco) zusammen. Das Freundt'sche Medium wird in situ bei 120°C sterilisiert, der 10-l-Fermenter 25 min und der 50-l-Fermenter 45 min. Die Glucose- und Hefelösungen werden separat 10 min bei 110°C sterilisiert und erst unmittelbar vor der Inokulation dem Medium beige-fügt.

1.1.1 Für die Inokulation mit Gefrierzellen werden 94 Vol.-% Freundt'schem Medium 5 Vol.-% Glucoselösung und 1 Vol.-% Hefeextraktlösung zugefügt.

1.1.2 Für die Beimpfung mit einer Suspensionskultur werden 84 Vol.-% Freundt'sches Medium, 5% Glucoselösung und 1% Difcolösung wie oben vereint.

1.2 Inokulation

2.1 Im Fall der Kultur aus Gefrierzellen werden dem in 1.1 beschriebenen Medium 1 ml/l Gefrierzellen zugesetzt. Die lag-Phase beträgt 2 bis 3 Tage.

2.2 Für Kulturen mit Suspensionskultur-Inokulum werden dem in 1.2 beschriebenen Medium 10 Vol.-% Suspensionskultur zugesetzt. Die lag-Phase beträgt in diesem Fall nur wenige Stunden.

1.3 Kultivierung von *Thermoplasma acidophilum*

Thermoplasma acidophilum wird bevorzugt in 10 l- oder 50 l-Fermentern gezüchtet. Alle Fermenterteile müssen aus Schwefelsäure-festem Material sein, z. B. Braun Biostat S (10 l, Glaskorpus), Braun Biostat 50 D (50 l, Edelstahlkorpus).

Ausgehend von Gefrierzellen, die wie unten beschrieben konserviert worden sind, kann ein 10-l-Fermenter ohne vorherige Flaschenzucht direkt angeimpft werden. Die Normalbedingungen bei der Fermenterzucht sind 59°C und pH 2. Nach Erreichen einer optischen Dichte von 0,4 (bei 578 nm) wird das erste Mal 1 Vol.-% Hefeextraktlösung nachgeführt, ein weiteres Mal nach weiteren 8 Stunden. Die Zugabe von Hefeextrakt läßt den pH im Medium ansteigen und wird durch Zugabe entsprechender Mengen von 1 M Schwefelsäure kompensiert. Nach Erreichen einer optischen Dichte (578 nm) von 0,6 bis 0,7 werden 5 l der 10-l-Fermenterkultur als Inokulum für einen 50-l-Fermenter entnommen. Dieser wird wie üblich kultiviert, wobei nach 20 und 28 Stunden jeweils 1 Vol.-% Hefeextrakt zugeführt wird. Nach Erreichen der stationären Phase wird 1 Liter als Inokulum für einen weiteren 10-l-Fermenter verwendet.

Thermoplasma acidophilum wächst obligat aerob, hohe Sauerstoffkonzentrationen sind für das Wachstum jedoch nicht vorteilhaft. Die Sauerstoffregulation wird auf 0,02 bis 0,03 vvm (Volumen Belüftung-pro Volumen Medium pro Minute) im 10-l-Fermenter und auf 0,04 vvm im 50-l-Fermenter eingestellt. Während des Wachstums nimmt der Sauerstoffgehalt des Mediums konstant und rapide bis unter die Grenze der Meßbarkeit ab, muß aber nicht gegenreguliert werden. Der pH wird während der Kultivierung laufend gemessen und bei pH-Veränderungen reguliert.

1.4 Zellernte

Das Wachstum von *Thermoplasma acidophilum* erreicht die stationäre Phase nach ca. 40 Stunden (OD₅₇₈ von ca. 0,6). Die Ernte sollte daher nach ca. 40 Stunden bei einer OD₅₇₈ von 0,6, maximal 0,7 erfolgen.

Die Zellkultur aus einem 10-l-Fermenter wird in einer Heraeus-Stockzentrifuge 15 Minuten bei 3000 × g zentrifugiert, der Überstand wird verworfen, der Niederschlag wird in Freundt'scher Lösung resuspendiert. Die Suspension wird 10 Minuten in einer Christzentrifuge bei maximaler Umdrehungszahl (4500 Upm, entsprechend in etwa 3000 × g) zentrifugiert, der Vorgang noch mindestens zweimal wiederholt, wobei Freundt'sche Lösung durch schwefelsaures Aqua bidest., pH 2, ersetzt wird, bis das Pellet weiß ist. Schließlich wird die weiße Zellaufmasse in Aqua bidest. suspendiert, in Methanol/Trockeneis eingefroren und bis zur Gewichtskonstanz gefriergetrocknet.

Die Zellkultur des 50-l-Fermenters wird mittels eines Pelicon-Tangentialfluß-Filtersystems zur Ernte auf ein Volumen von 2 l konzentriert. Dieses Konzentrat wird mit schwefelsaurem destilliertem Wasser, pH 2, gewaschen, bis das Filtrat klar und ungefärbt ist. Nun wird die konzentrierte Zellsuspension zentrifugiert (s. o.), das Pellet in Aqua bidest. resuspendiert, rezentrifugiert, resuspendiert, eingefroren und bis zur Gewichtskonstanz gefriergetrocknet.

1.5 Optische Kontrolle der Reinheit der *Thermoplasma acidophilum*-Kultur

Im Lichtmikroskop erscheint *Thermoplasma acidophilum* nach obiger Kultur mit einer Zelldichte von 10^7 Zellen/ml in meist isodiametrischer Form mit einem Durchmesser zwischen 1 und 3 μm , einige Zellen haben pleiomorphes Aussehen. Nach Laserlicht-Streumessungen im Malvern particle sizer liegt das Maximum der Größenverteilung bei 2,3 μm . Gefrierbruch-elektronenmikroskopisch erscheinen die Zellen meist rund, pleiomorphe Zellen weisen Längsachsen zwischen 1,1 und 2,7 μm und Querachsen um 0,6 μm auf. Die Zellen zeigen ein typisches Bruchverhalten, das sie von den meisten anderen Zellen unterscheidet: sie brechen senkrecht (quer) zur Membranebene, entlang der Kohlenwasserstoffketten und nicht entlang der inneren Grenzfläche der Doppelschicht (tangential).

Bei den gegebenen Wachstumsbedingungen (59°C, pH 2) können nur wenige Organismen in die Kultur einwachsen, z. B. *Bacillus acidocaldarius*. Züchtung bei pH 1,5 verhindert auch dies, ist allerdings mit einem Ausbeuteverlust hinsichtlich der gewünschten Lipidkomponente verbunden. Somit liegt das Züchtungsoptimum bei pH 2 unter Einhaltung möglichst steriler ("keinreduzierter") Bedingungen.

1.6 Konservierung

Die Konservierung von *Thermoplasma acidophilum* erfolgt bei -80°C oder in flüssigem N_2 . Zur Konservierung wird eine aktive Kultur (8–10 l) durch Zugabe von Calciumcarbonat auf pH 5,0–5,5 eingestellt. Nach Sedimentation von Calciumsulfat und überschüssigem Calciumcarbonat (mindestens 30 min ruhig stehenlassen) wird der Überstand abgehoben und unter sterilen Bedingungen 15 min bei $3000 \times g$ zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, und die *Thermoplasma acidophilum*-Zellen des Pellets werden in frisch zubereiteten 10 mM Natriumcitratpuffer, pH 5,5, resuspendiert. Die Suspension wird auf Eis in Cryocups auf 0,5 bis 3,0 ml portioniert, die Cryocups werden eine Stunde in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend darin oder bei -80°C aufbewahrt.

Zur Kultivierung werden die Cryocups mit den Zellen im Wasserbad bei 37°C aufgetaut.

Es ist unbedingt notwendig, daß die Konservierungsschritte steril durchgeführt werden, da der pH von 1–2, der bei der Kultivierung das Einwachsen der meisten Mikroorganismen verhindert, nicht eingehalten wird.

Beispiel 2

Extraktion und Reinigung der Tetraetherlipide aus *Thermoplasma acidophilum*

2.1 Extraktion von Gesamtlipid

Die Extraktion von Gesamt-Lipid wird mit gefriergetrocknetem Material durchgeführt. Dazu werden 8 bis 10 g gefriergetrocknete Zellmasse mit 300 ml eines Petrolether(Fraktion 60 bis 80°C)/2-Propanol-Gemisches (77 : 23 v/v) in einer Soxhletapparatur (rekurrierendes, geschlossenes System) 40 Stunden unter Rückfluß kontinuierlich extrahiert. Die beschriebene Extraktion ist nahezu quantitativ und führt zu ca. 1 g reiner Gesamtlipidfraktion.

750 mg der Gesamtlipidfraktion aus *Thermoplasma acidophilum* werden in 800 ml einer 1 M HCl-Lösung in Methanol 10 h unter Rückflußkühlung gekocht. Nach Verdampfen des Lösungsmittels wird der Rückstand in 100 ml CHCl_3 gelöst und mit H_2O gewaschen (5×100 ml). Die CHCl_3 -Fraktion wird verdampft und der Rückstand chromatographisch über Kieselgel (Kieselgel, Merck; Elutionsmittel CHCl_3) aufgetrennt. Die Fraktionen werden gesammelt und auf TLC-Platten analysiert (Laufmittel: CHCl_3 /Methanol 9 : 1), wobei bereits isolierte Tetraether als Standard dienen (Freisleben et al., 1993, Appl. Microbiol. Biotechnol., 40, 745–52). Nach Verdampfen des Elutionsmittels beträgt die Ausbeute ca. 390 mg Tetraetherlipide.

Beispiel 3

Herstellung der Tetraetherlipidderivate A, B und C

3.1 Herstellen von Dicarbonsäureverbindungen

80 mg Tetraetherlipide werden unter Rühren in einer Lösung von 1 mg 4-Methoxy-TEMPO Radikal in 2 ml CH_2Cl_2 bei 4°C gelöst (J. Org. Chem., 1985, 50, S. 1332). 5 ml Natriumhypochlorid (0,35 M, pH 8,6) werden der Lösung zugesetzt und die Mischung für 5 Min bei 4°C kräftig gerührt. Nach Zugabe von 30 ml CHCl_3 wird die organische Phase 5 mal mit 30 ml 0,25 M HCl gewaschen. Die organische Phase wird verdampft und der Rückstand auf Silicagel chromatographisch aufgetrennt (Elutionsmittel: CHCl_3 /Methanol/Essigsäure 100 : 5:0,1). Die Fraktionen werden gesammelt und auf TLC-Platte analysiert (Laufmittel: CHCl_3 /Methanol/Essigsäure 100 : 5:0,1). Nach Verdampfen des Elutionsmittels werden ca. 47 mg Dicarbonsäure-Verbindung aus den entsprechenden Fraktionen gewonnen (ca. 50% Ausbeute).

3.2 Herstellen von Dicarbonsäurechlorid

45 mg der Dicarbonsäure-Verbindung werden in einer Lösung von Thionylchlorid (100 μl) in 5 ml trockenem CH_2Cl_2 gelöst und refluxiert. Nach ca. 6 Stunden ist das Lösungsmittel verdampft. Das entstandene Dicarbonsäurechlorid kann

ohne weitere Reinigungsschritte eingesetzt werden.

3.3. Herstellen von TEL-Derivaten

3.2.1 Tetraetherlipidderivat B

50 µl 3-Dimethylaminopropylamin werden einer Lösung von ca. 45 mg Dicarbonsäurechlorid in 5 ml trockenem CH_2Cl_2 zugesetzt. Nach 5 Min wird die Mischung fünfmal mit 30 ml Wasser gewaschen, das Lösungsmittel evaporiert und der Rückstand chromatographisch auf Kieselgel aufgetrennt. (Elutionsmittel: CHCl_3 /Methanol/Essigsäure, 80 : 20 : 0,5). Die Fraktionen werden gesammelt und auf TLC-Platten mit dem gleichen Laufmittel wie oben genannt analysiert. Aus den Fraktionen, in denen das Tetraetherlipidderivat A festgestellt wird, wird das Lösungsmittel verdampft. Das Verfahren führt zu ca. 35 mg Derivat B. 10

3.2.2 Tetraetherlipidderivat A

Derivat A wird durch ein ähnliches Verfahren gewonnen, bei dem anstelle von 100 µl 3-Dimethylaminopropylamin 100 µl 1,3-Diaminpropan eingesetzt werden. 15

3.2.3 Tetraetherlipidderivat C

Derivat C wird gewonnen, indem Derivat B in einer Lösung aus 10 µl Dimethylsulfat in CH_2Cl_2 (5 ml) gelöst wird. Nach 20 h wird das Lösungsmittel verdampft, der Rückstand in 10 ml CHCl_3 gelöst und dreimal in je 20 ml 0,1 M HCl gewaschen. Nach Evaporieren der organischen Lösung werden ca. 10 mg Derivat C gewonnen (Ausbeute ca. 95%). 20

3.4 Herstellen eines Fluoreszenz-markierten Tetraetherlipidderivates

Zur Klärung der Frage, ob die erfindungsgemäßen positiv geladenen Tetraetherlipidderivate in Zellen eindringen können, ist ein neues fluoreszierendes Tetraetherlipidderivat synthetisiert worden. 25

Fluoreszenz-markiertes Tetraetherlipidderivat wird gewonnen, indem 2 mg Rhodaminisothiocyanat und 5 µl Triethylamin einer Lösung von 2 mg Derivat A in 2 ml trockenem CH_2Cl_2 zugesetzt werden. Nach 15 h wird die Lösung fünfmal mit 30 ml Wasser gewaschen, das Lösungsmittel evaporiert und der Rückstand chromatographisch auf Kieselgel aufgetrennt (Elutionsmittel: CHCl_3 /Methanol/Essigsäure, 80 : 20 : 0,5). Die Fraktionen werden gesammelt und Proben davon auf TLC-Platten analysiert. Die Fraktionen, die das fluoreszierende Lipid enthalten, werden vereint und das Lösungsmittel verdampft. Das Verfahren führt zu ungefähr 2 mg Tetraetherlipid-Rhodamin. 30

Beispiel 4

Herstellung von Lipofektionsmittel

4.1 Leeres Lipofektionsmittel

Für die Herstellung von Lipofektionsmittel werden die Tetraetherlipidderivate A, B oder C verwendet. Zur Bildung von Lipofektionsmittel wird das Tetraetherlipidderivat jeweils in Chloroform/Methanol (1/1, v/v) gelöst (2 mg/ml). Durch Verdampfen des Lösungsmittels entsteht ein Lipidfilm. Der Lipidfilm wird in Puffer A (150 mM NaCl, 50 mM Hepes, pH 7,4) bei Raumtemperatur für 48 h hydratisiert (Endkonzentration 0,5–2 mg Lipid/500 µl Puffer A), anschließend in einem Ultraschallbad (Branson 1210) 15 Min beschallt und schließlich 10 Min bei Raumtemperatur mit einer Ultraschallspitze (Branson BIS, "cycle mode", Position 40) beschallt. Die Lipidlösung in Puffer A erscheint trüb ohne Aggregate oder erkennbare Präzipitate. 45

4.2 DNA-Lipofektionsmittelkomplexe

4.2.1 Verfahren

Zum Herstellen von DNA-Lipofektionsmittelkomplexen werden 3–5 µl in Puffer A suspendierte Lipide (1 mg/ml) in 100 µl serumfreiem Medium gelöst. 1–2 µg DNA (1 mg/ml) werden in 100 µl serumfreiem Medium verdünnt. Die beiden Lösungen werden vorsichtig gemischt und 15 Min bei Raumtemperatur inkubiert, um DNA-Lipidkomplexe zu bilden. Typischerweise treten keine Aggregate bei der Komplexbildung auf. Vor jeder Transfektion werden 800 µl serumfreies Medium zugesetzt, so daß ein Endvolumen von 1 ml erreicht wird. 50

4.2.2 Nachweis der Bildung der DNA-Lipofektionsmittelkomplexe

Die Bildung der DNA-Lipofektionsmittelkomplexe wurde fluorometrisch untersucht. Es ist bekannt, daß die Bildung von Komplexen aus DNA und kationischen Lipiden die Bindung von Ethidiumbromid an DNA verhindert (Gershon et al., Biochemistry 32, 7143–7151, 1993). Da die Fluoreszenz von Ethidiumbromid-DNA-Komplexen der Menge freier DNA in Lösung proportional ist, kann dieses Verfahren verwendet werden, um DNA-Lipidkomplexe zu quantifizieren. Dazu wurden DNA-Lipidkomplexe aus Tetraetherlipidderivat B und pSV-lacZ mit unterschiedlichen Tetraetherlipidderivat:DNA-Verhältnissen in 1 ml 150 mM NaCl, 50 mM Hepes, pH 7,4, vorgebildet. Anschließend wurde Ethidiumbromid bis zu einer Endkonzentration von 10^{-7} M zugefügt. Die Fluoreszenz von Ethidiumbromid-DNA-Komplexen wurde 65

durch Anregen bei 518 nm und Messen der Emission bei 605 nm verfolgt. Die Ergebnisse sind in **Abb. 2** gezeigt und weisen daraufhin, daß die Bildung von DNA-Tetraetherlipidderivat-Komplexen bei einem molaren Verhältnis von 1 : 1 auftritt.

Die Bildung der Komplexe wurde außerdem unter Verwendung von 1%-igen Agarosegelen gezeigt. In diesem unabhängigen Test wird die Bildung von DNA-Tetraetherlipidderivat-Komplexen durch das Verschwinden freier DNA sichtbar gemacht (**Abb. 3, Spur 4**).

Diese Ergebnisse, die mit zwei voneinander unabhängigen Versuchen erhalten worden sind, weisen darauf hin, daß die Bildung von Tetraetherlipidderivat-DNA-Komplexen bei einem molaren Verhältnis von 1 : 1 auftritt.

Beispiel 5

Transfektion mit Tetraetherlipidderivat-enthaltendem Lipofektionsmittel

5.1 Transfektion mit pSV-lacZ

Transfektionen werden mit einem pSV-lacZ-Plasmid (Promega) als Reportergenkonstrukt durchgeführt. 1×10^5 BHK (Baby Hamster Kidney)-Zellen werden auf Platten mit 6 Vertiefungen plattiert. Nach 24 h Inkubation bei 37°C in CO₂-begaster Atmosphäre erreichen die Zellen eine Dichte von 25–50% und können für die Transfektion eingesetzt werden. Direkt vor der Transfektion werden die Zellen mit 2 ml serumfreiem Medium gewaschen. 1 ml der den DNA-Lipidkomplex enthaltenden Lösung (s. Beispiel 4.2) wird zugesetzt. Nach 5 h wird das die DNA enthaltende Medium durch normales Wachstumsmedium, das 10% Serum enthält, ersetzt. Kürzere Inkubationszeiten (2–4 h) führen ebenfalls zu erfolgreichen Transfektionen.

19 h nach der Transfektion werden die Zellen einmal in PBS gewaschen, mit eiskaltem Methanol (–20°C) fixiert, dreimal mit PBS gewaschen und für 16 h in einer Lösung aus 4 Ferricyanid (Sigma), 1 mM MgCl₂, 0,1% X-gal (Roth) in PBS, pH 7,4 inkubiert, um die Expression von β -Galactosidase nachzuweisen.

Die Transformationseffizienz der Tetraetherlipidderivate A, B und C wurde mit den kommerziell erhältlichen Transfektionsmitteln Lipofectin® und Lipofectamin® (Gibco/BRL) verglichen. Die Transfektionseffizienz wurde dabei als Prozentsatz blauer Zellen, bezogen auf die Gesamtzellzahl, angegeben. Der Vergleich zeigte, daß die Transformationseffizienz für alle erfindungsgemäßen Verbindungen in der gleichen Größenordnung wie für die kommerziellen Agenzien lag.

Unter Verwendung des Plasmides pSV-lacZ wurde ferner das optimale Verhältnis von DNA zu Lipid bestimmt. Dabei wurden die besten Transfektionsergebnisse mit einem molaren Verhältnis von 1 : 1 DNA/Lipid erhalten (**Abb. 4**). Das Maximum der β -Galactosidase-Expression wurde 19 h nach dem Beginn der gemeinsamen Inkubation der Zellen mit den DNA-Lipidkomplex beobachtet. Wie in **Abb. 5** gezeigt wird, betrug unter diesen Bedingungen die Transfektionseffizienz 12%, bezogen auf die Gesamtzahl der eingesetzten Zellen.

5.2 Transfektion mit fluoreszierenden Tetraetherlipidderivaten

Eine Fluoreszenz-markierte Lipofektionsmittelsuspension wird hergestellt durch Beschallen von 1 mg einer Mischung aus Tetraetherlipidderivat A, B oder C und Tetraetherlipid-Rhodamin (s. Beispiel 3.3) (100 : 1 molares Verhältnis) in 1 ml eines Puffers aus 150 mM NaCl, 50 mM Hepes, pH 7,4. Die Lipidkonzentrationen von Rhodamin-markierten Liposomen oder DNA-Lipidkomplexen reicht von 10–100 µg/ml. Die Zellen werden 70 Min bei 38°C mit den Rhodamin-markierten Lipofektionsmitteln inkubiert, dreimal mit PBS gewaschen und anschließend in einem "reverse fluorescent microscope" analysiert.

Die Analyse zeigte eine diffuse Fluoreszenz, die im Zytoplasma der Zellen zu beobachten war (**Abb. 1**). Dieses Ergebnis erlaubt die Schlußfolgerung, daß die erfindungsgemäßen Tetraetherlipidderivate die Zellmembran durchqueren.

6. Transfektionseffizienz von Mischlipofektionsmitteln

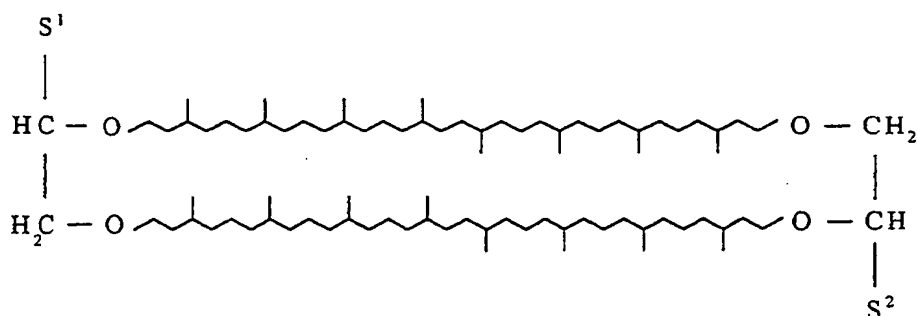
In der Literatur ist gezeigt worden (Felgner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 84, 7413–7417, 1987), daß durch Mischen von Lipofectin® mit DOPE (Sigma) (1 : 1, w/w) erhöhte Transfektionsraten erzielt werden können. Deshalb wurde der Einfluß des Zusatzes verschiedener Lipide zu den erfindungsgemäßen Tetraetherlipidderivaten auf die Effizienz der Zelltransfektion untersucht.

Im einzelnen wurde zugesetzt: MPL (Gesamtphospholipidfraktion aus Thermoplasma acidophilum), PC (Phosphatidylcholin) und DOPE (Dioleylphosphatidylethanolamin). Dabei wurde beobachtet, daß das Mischen der erfindungsgemäßen Tetraetherlipidderivate A, B bzw. C mit MPL in einem Verhältnis von 1 : 1 (w/w) die Transfektionseffizienz nicht beeinträchtigt, während die Mischung der erfindungsgemäßen Tetraetherlipidderivate mit MPL bei einem Mischungsverhältnis von 1 : 2 (molares Verhältnis Tetraetherlipidderivat/MPL) die Transfektionseffizienz stark beeinträchtigt. Eine Mischung aus erfindungsgemäßen Tetraetherlipidderivaten mit DOPE (molares Verhältnis von 1 : 1) erhöht die Transfektionseffizienz, während eine Mischung von Tetraetherlipidderivat mit PC (molares Verhältnis von 1 : 1) sie erniedrigt.

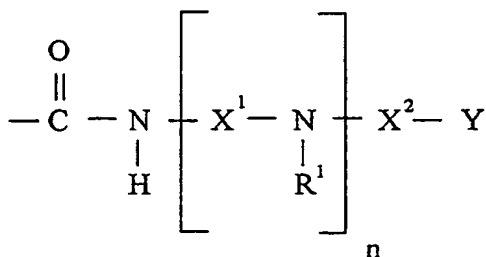
Aus diesen Versuchen geht hervor, daß DOPE ein vielversprechender Zusatz zum Tetraetherlipidderivat A ist; Die Ergebnisse sind in **Abb. 6** graphisch dargestellt.

Patentansprüche

1. Tetraetherlipidderivat der allgemeinen Formel I:



wobei S^1 und S^2 gleich oder verschieden sein können und jeweils die folgende Bedeutung haben:



Y kann $-NR^2R^3$ oder $-N^{\oplus}R^4R^5R^6$ bedeuten;

X^1 und X^2 können gleich oder verschieden sein und sind jeweils unabhängig voneinander ausgewählt aus der Gruppe, die ein verzweigtes oder unverzweigtes Alkyl- oder Alkenyl- mit 2 bis 20 Kohlenstoffatomen umfaßt;

R^1 bis R^6 können gleich oder verschieden sein und sind jeweils unabhängig voneinander ausgewählt aus der Gruppe, die umfaßt: Wasserstoff, verzweigte oder unverzweigte Alkyl-, Alkenyl-, Aralkyl- oder Arylgruppen mit 1 bis 12 Kohlenstoffatomen, wobei jeweils einer der Reste R^2 bis R^6 weiter einen Antikörper gegen Zelloberflächenmoleküle oder einen Liganden für Zelloberflächen-Rezeptoren umfassen kann; und

n kann eine ganze Zahl zwischen 0 und 10 bedeuten,

sowie durch Bildung von Pentazyklen im Tetraethergrundgerüst gebildete Modifikationen davon.

2. Tetraetherlipidderivat nach Anspruch 1, wobei S^1 und S^2 gleich sind.

3. Tetraetherlipidderivat nach Anspruch 1 oder 2, wobei X^1 ein Alkyl- oder Alkenyl- mit 2 bis 10, bevorzugt mit 3 bis 6 Kohlenstoffatomen ist.

4. Tetraetherlipidderivat nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei X^2 ein Alkyl- oder Alkenyl- mit 2 bis 10, bevorzugt mit 3 bis 6 Kohlenstoffatomen ist.

5. Tetraetherlipidderivat nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei n 0 bis 3, bevorzugt 0 ist.

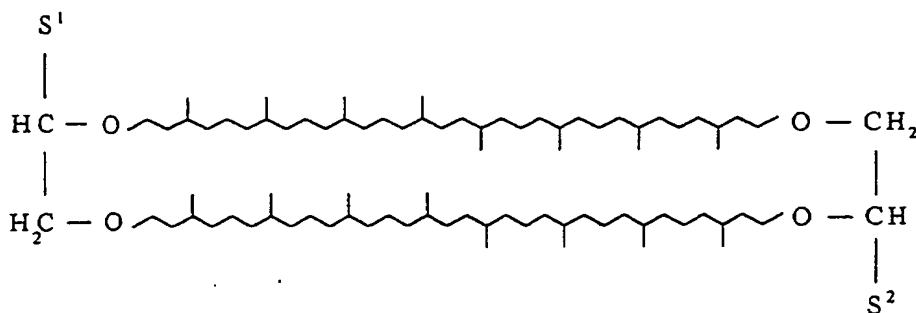
6. Tetraetherlipidderivat nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei Y jeweils $-NR^2R^3$ ist und wobei R^2 und R^3 aus der Gruppe ausgewählt sind, die umfaßt:

-H, $-CH_3$, $-C_2H_5$ und $-C_3H_7$.

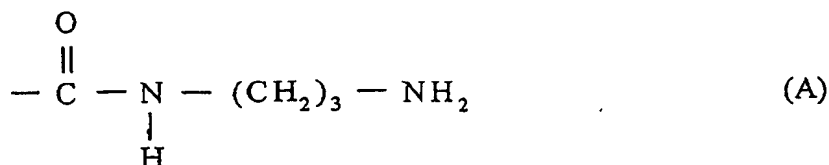
7. Tetraetherlipidderivat nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei Y jeweils $-N^{\oplus}R^4R^5R^6$ ist und wobei R^4 , R^5 und R^6 gleich oder verschieden sein können und aus der Gruppe ausgewählt sind, die umfaßt:

-H, $-CH_3$, $-C_2H_5$ und $-C_3H_7$.

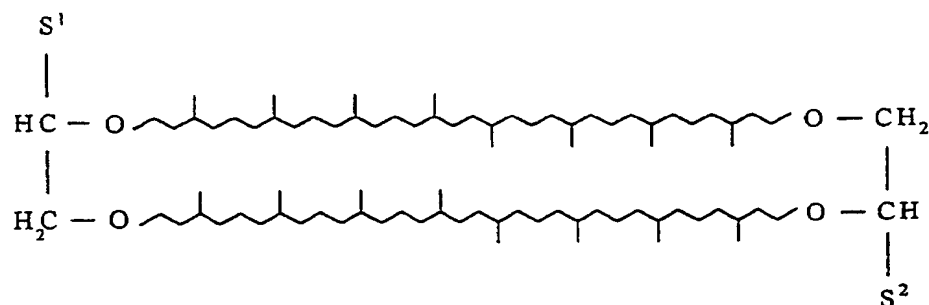
8. Tetraetherlipidderivat nach Anspruch 1 mit der Formel A:



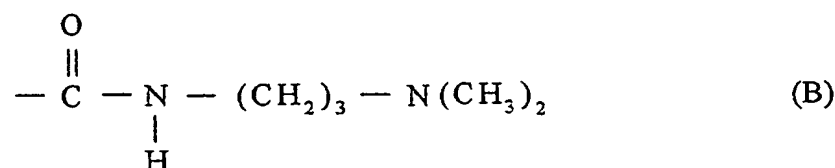
wobei $S^1 = S^2$ ist und bedeutet



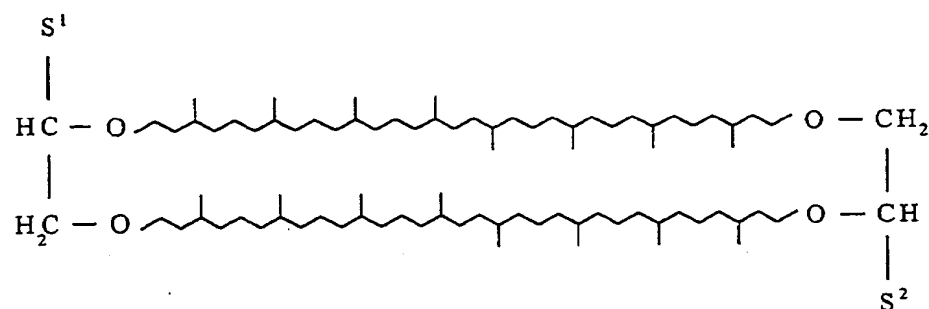
9. Tetraetherlipidderivat nach Anspruch 1 mit der Formel B:



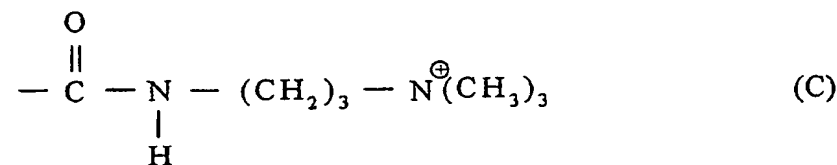
wobei $\text{S}^1 = \text{S}^2$ ist und bedeutet



10. Tetraetherlipidderivat nach Anspruch 1 mit der Formel C:



wobei $\text{S}^1 = \text{S}^2$ ist und bedeutet



11. Liposom, enthaltend ein oder mehrere Tetraetherlipidderivate gemäß einem der Ansprüche 1 bis 10.

12. Liposom nach Anspruch 11, enthaltend weitere Doppelschicht-bildende kationische oder neutrale Lipide.

13. Liposom nach Anspruch 12, enthaltend das kationische Lipid DOTMA und/oder DOTAP und/oder DOSPER.

14. Liposom nach einem der Ansprüche 11 bis 13, enthaltend das neutrale Lipid DOPE und/oder Cholesterin.

15. Lipidagglomerat, enthaltend ein oder mehrere Schichten einer oder mehrerer Tetraetherlipidderivate nach einem der Ansprüche 1 bis 10.

16. Lipidagglomerat nach Anspruch 15, enthaltend weitere Doppelschicht-bildende kationische oder neutrale Lipide.

17. Lipidagglomerat nach Anspruch 16, enthaltend das kationische Lipid DOTMA und/oder DOTAP und/oder DOSPER.

18. Lipidagglomerat nach Anspruch 16, enthaltend das neutrale Lipid DOPE und/oder Cholesterin.

19. Liposom nach einem der Ansprüche 11 bis 14 oder Lipidagglomerat nach einem der Ansprüche 15 bis 18, wo-

bei das Gew.-Verhältnis von Tetraetherlipidderivat zu weiteren Lipiden 5 : 1 bis 1 : 5 beträgt.

20. Liposom oder Lipidagglomerat nach Anspruch 19, wobei das Gew.-Verhältnis von Tetraetherlipidderivat zu weiterem Lipid zwischen 1 : 2 und 1 : 0,5, bevorzugt 1 : 1 beträgt.

21. Liposom nach einem der Ansprüche 11 bis 14 oder Lipidagglomerat nach einem der Ansprüche 15 bis 18, enthaltend weiterhin Nukleinsäuremoleküle.

22. Pharmazeutische Zusammensetzung, enthaltend Liposomen nach einem der Ansprüche 11 bis 14 oder Lipidagglomerate nach einem der Ansprüche 15 bis 18 und physiologisch verträgliches Verdünnungsmittel.

23. In vitro-Transfektionskit, enthaltend Liposomen nach einem der Ansprüche 11 bis 14 und/oder Lipidagglomerate nach einem der Ansprüche 15 bis 18 sowie geeignete Puffer.

24. Verwendung von Liposomen nach einem der Ansprüche 11 bis 14 oder von Lipidagglomeraten nach einem der Ansprüche 15 bis 18 zum Herstellen eines Medikamentes für die Gentherapie an Säugern.

25. Verwendung von Liposomen nach einem der Ansprüche 11 bis 14 oder eines Lipidagglomerates nach einem der Ansprüche 15 bis 18 zur Transfektion eukaryontischer Zellen in vitro.

Hierzu 9 Seite(n) Zeichnungen

Abb. 1

(A)



(B)



Abb. 2

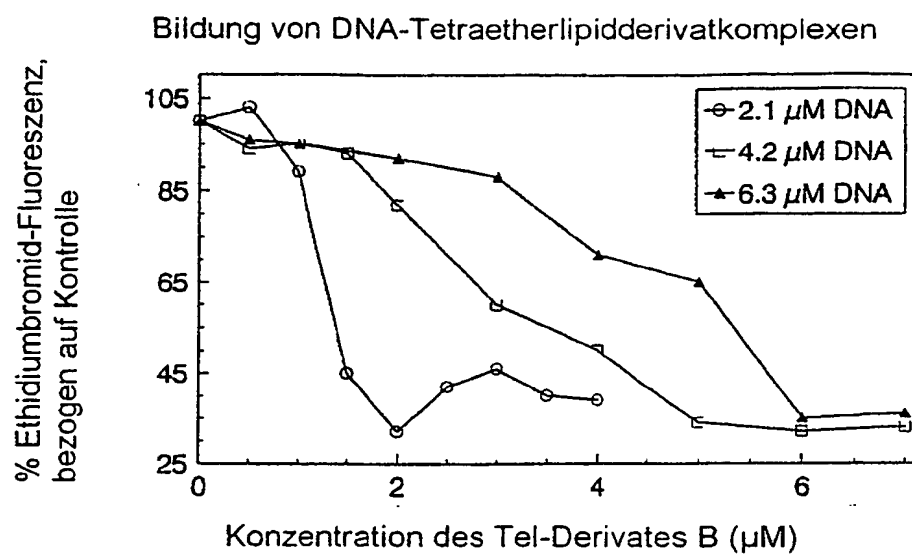


Abb. 3

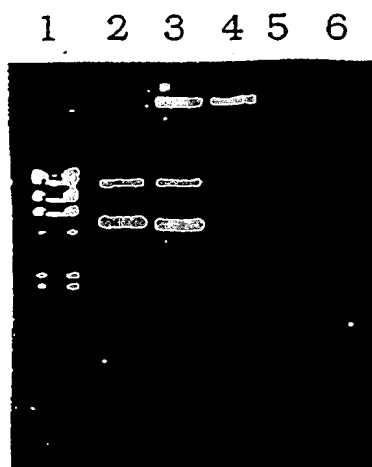


Abb. 4

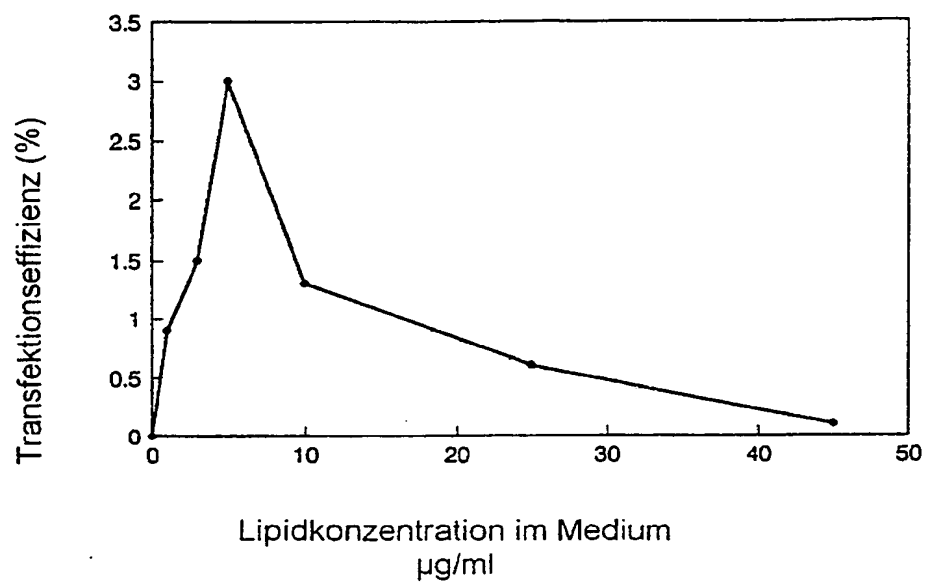


Abb. 5

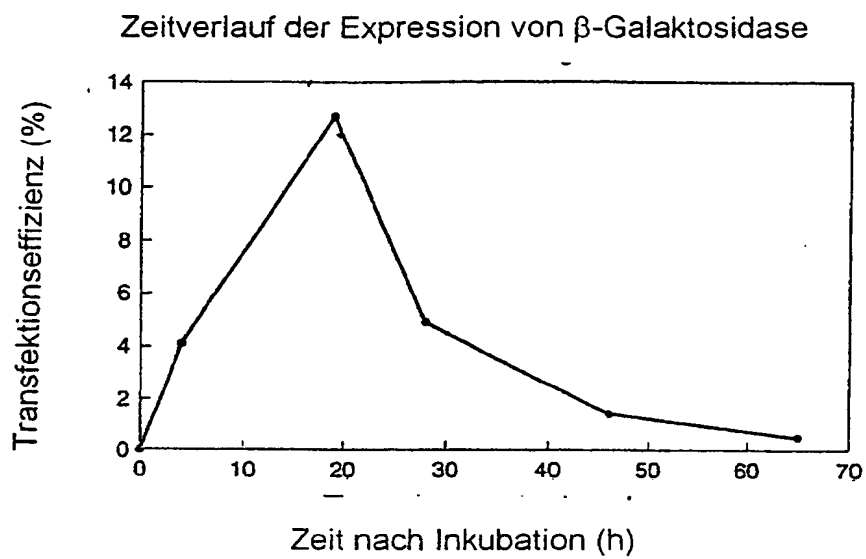


Abb. 6

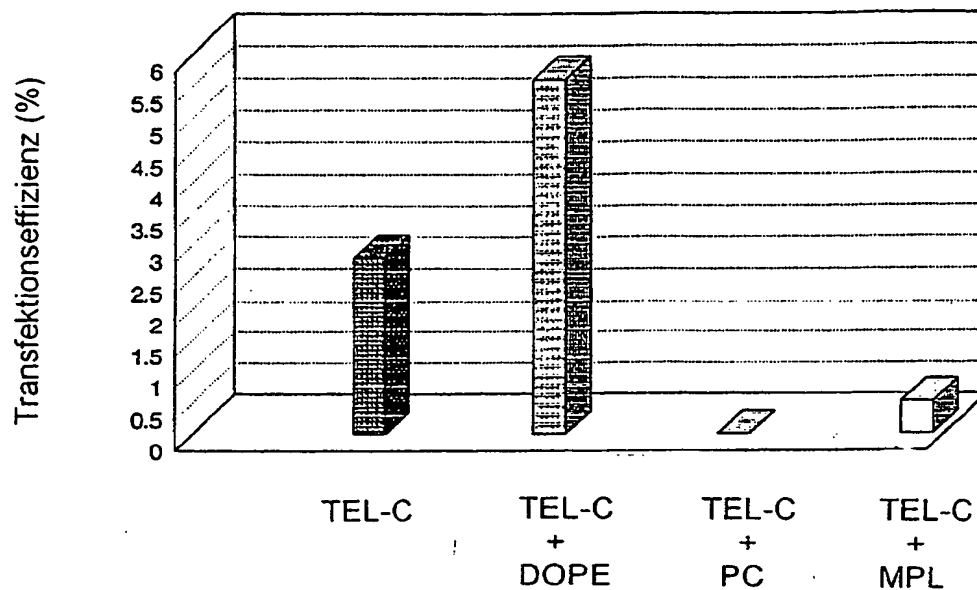
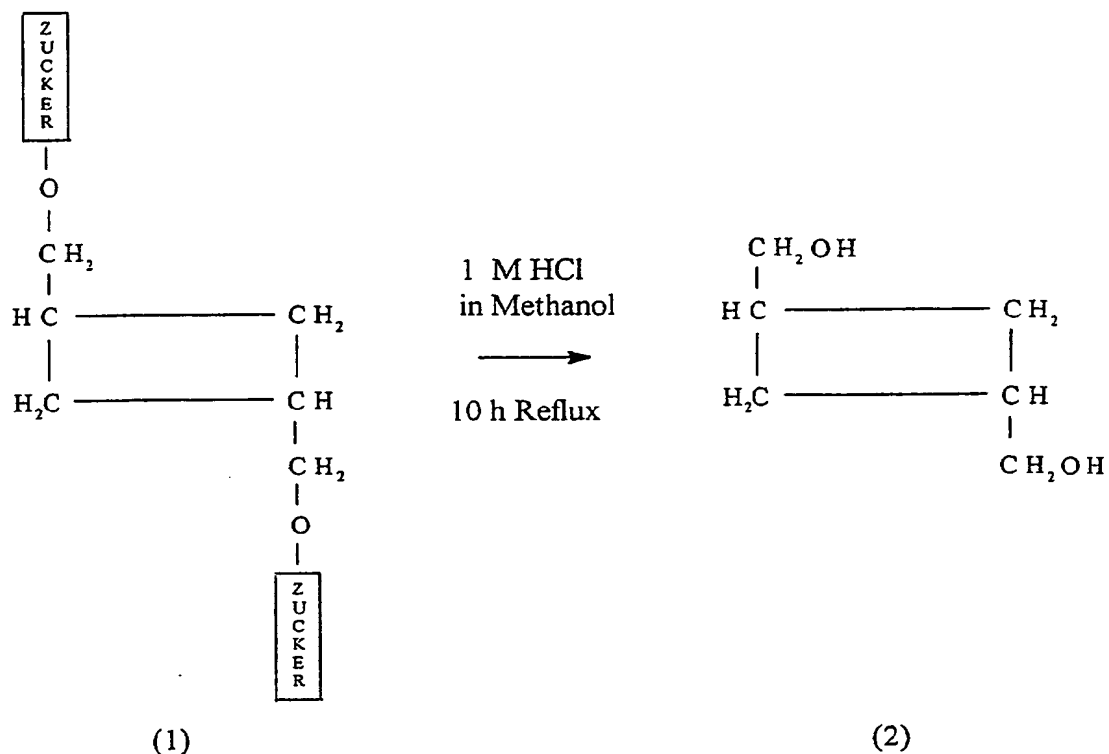


Abb. 7a

(Reaktion Nr. 1)



(Reaktion Nr. 2)

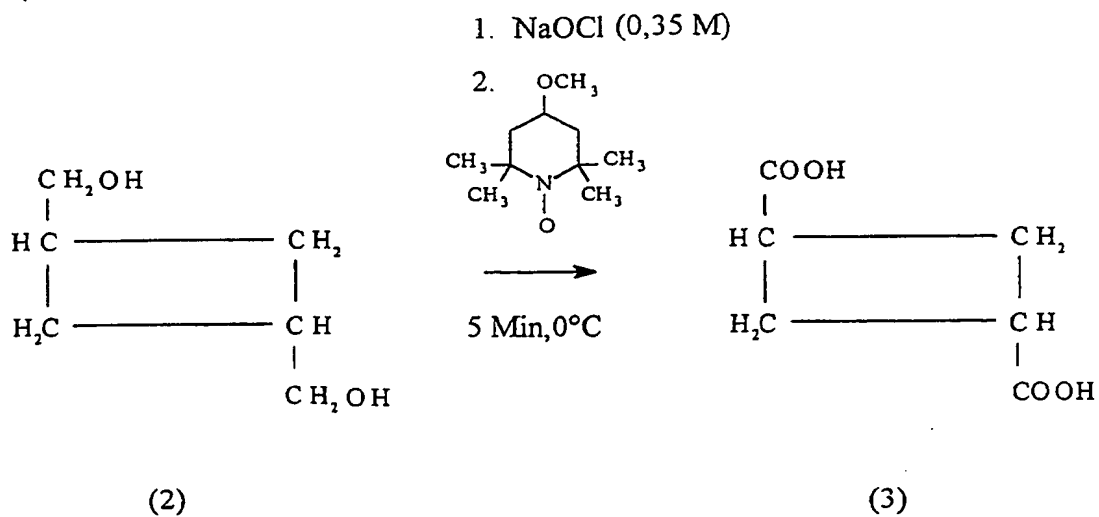
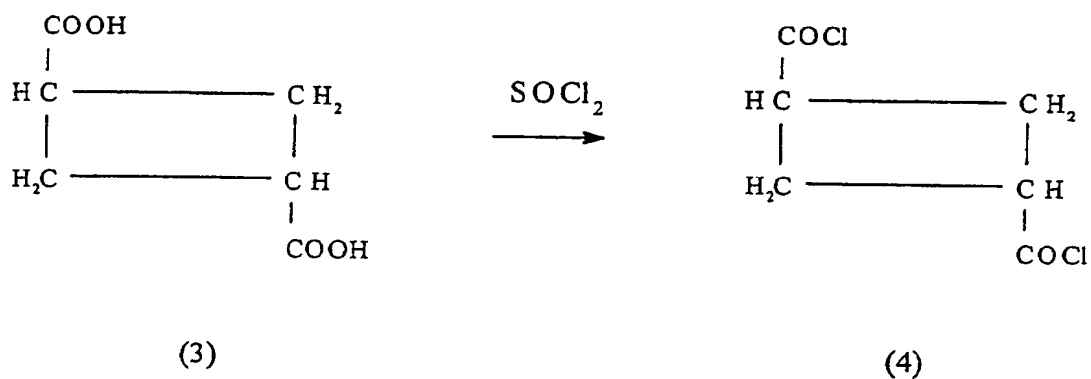


Abb. 7b

(Reaktion Nr. 3)



(Reaktion Nr. 4A)

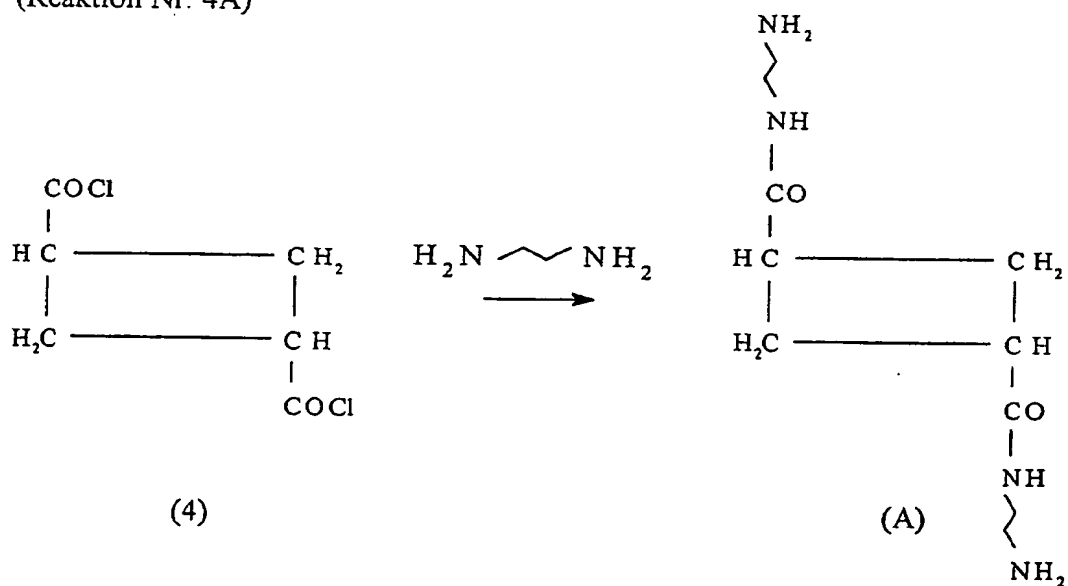
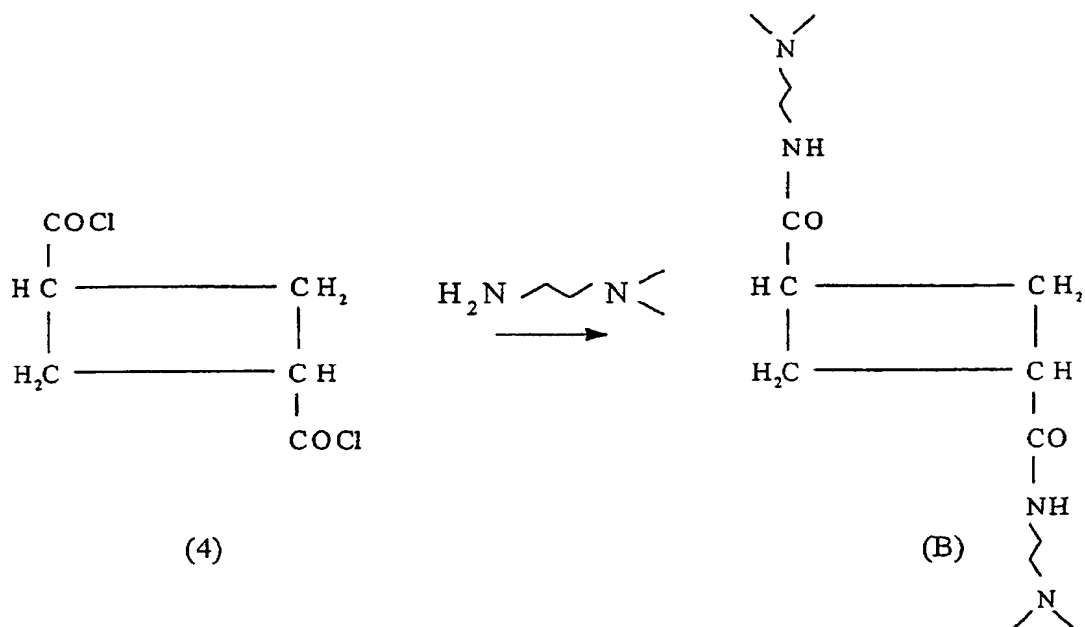
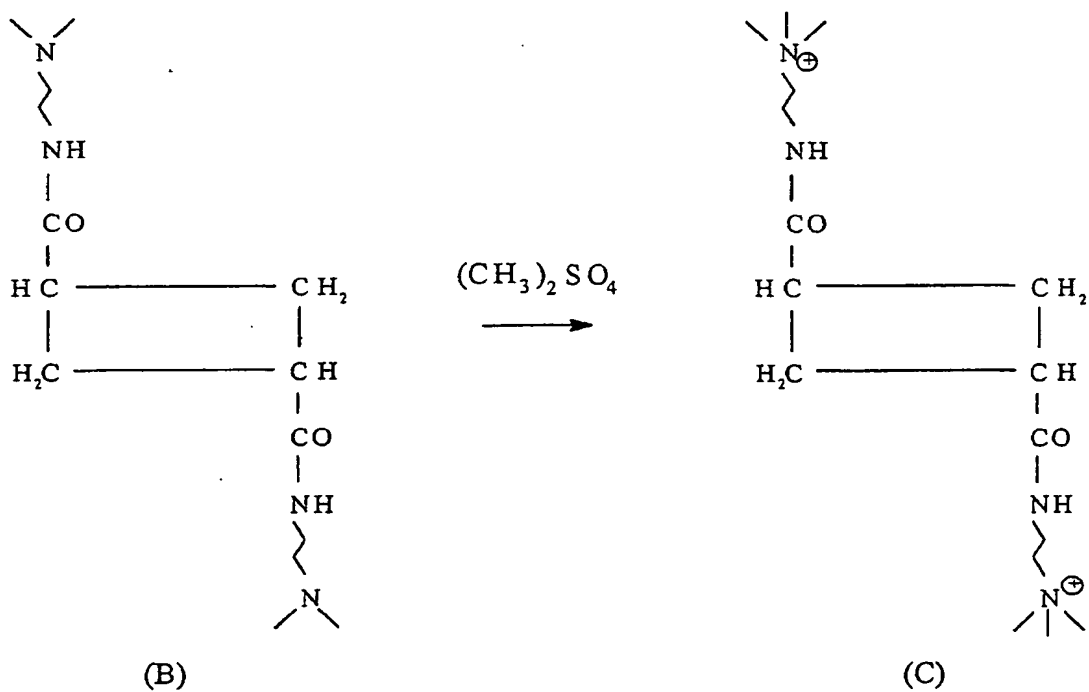


Abb. 7c

(Reaktion Nr. 4B)



(Reaktion Nr. 5)



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.